

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :

2 795 739

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

99 08469

⑤① Int Cl⁷ : **C 12 N 15/31**, C 12 N 15/82, A 01 H 5/00, A 01 N 63/
00, C 07 K 14/325 // (C 12 N 15/31, C 12 R 1:07)

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ GENE SYNTHETIQUE CRYIC ET PLANTES TRANSGENIQUES EXPRIMANT LEDIT GENE.

②② Date de dépôt : 01.07.99.

③③ Priorité :

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA et CENTRE DE
COOPERATION INTERNATIONALE EN
RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE
DEVELOPPEMENT — FR.

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 05.01.01 Bulletin 01/01.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 15.08.03 Bulletin 03/33.

⑦② Inventeur(s) : GIBAND MARC, PANNETIER
CATHERINE, MAZIER MARIANNE, CHAUFaux
JOSETTE et TOURNEUR JACQUES.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

FR 2 795 739 - B1



GENE SYNTHETIQUE *cryIC* ET PLANTES TRANSGENIQUES EXPRIMANT
LEDIT GENE

L'invention est relative à la construction
d'un gène synthétique *cryIC* de *Bacillus thuringiensis* et
5 à son expression dans les plantes pour les rendre
résistantes aux attaques des insectes.

Bacillus thuringiensis (Bt) produit lors de sa
sporulation, différentes toxines insecticides (protéines
Cry). Ces protéines sont produites sous forme de
10 protoxines cristallines, qui sont solubilisées après
ingestion par les insectes et subissent dans l'intestin
de ceux-ci une protéolyse qui libère la toxine active. On
connaît actuellement plus d'une centaine de protéines de
la famille Cry, regroupées selon leurs homologues de
15 séquence et leur spécificité d'action.

L'utilisation des toxines insecticides de
Bacillus thuringiensis dans le cadre de la lutte contre
les insectes ravageurs fait l'objet d'un grand intérêt,
en particulier du fait de l'innocuité de ces toxines pour
20 l'environnement. Notamment, on a construit des plantes
transgéniques exprimant des gènes bactériens (gènes *cry*),
dans le but d'augmenter leur résistances aux attaques des
insectes phytophages. Il a toutefois été constaté que le
niveau d'expression des gènes bactériens *cry* « natifs »
25 dans les plantes était trop faible pour conférer une
résistance efficace. Pour augmenter l'expression des
gènes *cry*, il a été proposé de modifier leurs séquences,
notamment en éliminant diverses séquences qui peuvent
interférer avec l'expression dans les cellules
30 eucaryotes, et en remplaçant les codons utilisés chez les
procaryotes pour codons préférentiellement utilisés chez
les plantes. Les gènes « synthétiques » créés de la sorte
peuvent avoir une expression jusqu'à 500 fois plus élevée
que celle observée pour les gènes *cry* natifs ; il en
35 résulte une protection beaucoup plus efficace des plantes

transformées par lesdits gènes [pour revue, voir MAZIER et al, Biotechnol. Ann. Rev., 3: 313-347, (1997)].

5 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* produit une protéine, dénommée CryIC, toxique envers les lépidoptères du genre *Spodoptera*, et notamment *Spodoptera littoralis*, qui est un ravageur du coton. Le gène correspondant (*cryIC*) a été cloné et séquencé [SANCHIS et al. Mol. Microbiol., 3: 229-238, (1989)].

10 Le transfert du gène natif *cryIC* dans des plantes permet de conférer à celles-ci un certain niveau de résistance envers *S. littoralis*. Néanmoins, le transgène ne s'exprime pas à un niveau assez élevé pour procurer une protection efficace à la plante ; par exemple, dans le cas de plants de tabac transgéniques, le
15 nombre de plantes montrant une résistance à cet insecte reste faible (2 plantes sur une trentaine de plantes testées montrent >80% de mortalité en 7 jours vis-à-vis de larves au stade L1-L2 pré-mue), et la mortalité observée décroît au fur et à mesure que la plante testée
20 vieillit [MAZIER et al. Plant Sci., 127: 179-190, (1997)].

VAN DER SALM et al. [Plant Mol. Biol., 26: 51-59, (1994)] décrivent l'expression dans des plants transgéniques de tabac et de tomate d'un gène *cryIC* synthétique ; les modifications apportées, limitées à 45
25 nucléotides dans 9 régions du gène *cryIC* permettent une expression du transgène à un niveau suffisant pour pouvoir détecter les ARNm, mais ne permettant pas la détection des protéines correspondantes. Cette amélioration du niveau d'expression s'accompagne
30 cependant d'une certaine augmentation de la protection contre des larves de *Manduca sexta* et *Spodoptera exigua*.

STRIZHOV et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 15012-15017, (1996)] décrivent l'expression d'un gène *cryIC* synthétique dans des plants transgéniques de
35 luzerne et de tabac. Ce gène code un fragment N-terminal de 630 acides aminés de la protoxine. Les modifications

apportées par rapport à la séquence native codant le même fragment concernant 286 bases sur un total de 1890, soit 15% des bases, et touchent 249 codons sur 630, soit 39,5% des codons. Ce gène synthétique, associé à la séquence de tête (leader sequence) du TMV, a été placé sous contrôle du promoteur 35S de CaMV, renforcé par la présence de 4 copies des éléments amplificateurs. L'expression de cette construction dans des plants transgéniques de luzerne et de tabac aboutit à la production de protéines CryIC à un niveau détectable, variant, selon le plant concerné, entre 0,01 et 0,2% des protéines solubles totales, et permet d'obtenir une protection contre des larves de *Spodoptera littoralis* et *Spodoptera exigua* issues de souches sensibles à CryIC. L'expression de la même construction chez le brocoli a permis d'obtenir une production de CryIC plus importante que celle obtenue chez la luzerne et le tabac, et allant jusqu'à 0,4% des protéines totales solubles [CAO et al., Mol. Breed., 5, 131-141, (1999)] ; les plants de brocolis transgéniques produisant la plus grande quantité de protéine CryIC sont protégés contre des larves d'une souche de *Plutella xylostella* sensible à CryIC, et également contre des larves d'une souche de *Plutella xylostella* 100 fois plus résistante à CryIC que la précédente.

Les Inventeurs ont recherché s'il était possible d'augmenter encore, par l'apport de modifications supplémentaires dans la séquence du gène *cryIC*, le niveau d'expression de la toxine CryIC dans des plantes transgéniques et d'améliorer la protection conférée à ces plantes.

Ils sont ainsi parvenus à obtenir un gène *cryIC* synthétique s'exprimant à un niveau très élevé dans des plantes transgéniques, et conférant une protection plus efficace que les gènes *cryIC* synthétiques précédemment décrits dans l'art antérieur, notamment vis-à-vis de larves de *Spodoptera* à des stades tardifs de

leur développement. En outre, ils ont constaté que l'expression de ce gène permettait de protéger les plantes contre des insectes ayant développé une résistance à la toxine CryIC.

5 La présente invention a pour objet tout acide nucléique comprenant la séquence nucléotidique de ce gène *cryIC* synthétique. Cette séquence est représentée dans la liste de séquences en annexe par le numéro SEQ ID NO: 1.

10 Par rapport à la séquence nucléotidique de la portion correspondante du gène bactérien, 25,5% des bases ont été remplacées, et 65% des codons modifiés dans le gène *cryIC* synthétique conforme à l'invention.

15 La séquence peptidique diffère essentiellement de la séquence publiée par SANCHIS et al. (1989) par le remplacement des huit premiers acides aminés de la séquence sauvage (M-E-E-N-N-Q-N-Q) par la séquence M-A-Q-I-P-P-Q, et le remplacement de la séquence en acides aminés C₃₇₅-Q-R-H-H₃₇₉ par la séquence W₃₇₅-P-A-P-P₃₇₉, et des acides aminés I₃₆₅ et G₃₈₅ par N₃₆₅ et V₃₈₅, afin
20 de corriger une erreur signalée [STRIZHOV et al. Mol. Gen. Genet., 253: 11-19, (1996)] dans la séquence initialement publiée par SANCHIS et al.

25 Les modifications apportées permettent d'obtenir dans les plantes transgéniques un taux d'expression très élevé. Dans des plants de tabac transgénique on observe ainsi un niveau d'expression de CryIC, variant, selon le plant concerné, entre 0,15 et 1% des protéines solubles totales.

30 La présente Invention a également pour objet des vecteurs recombinants comprenant une séquence d'ADN conforme à l'invention, et utilisables notamment pour le transfert de ladite séquence et/ou son expression dans des cellules de plantes hôtes.

35 Pour l'expression dans des plantes ou des cellules de plantes, ladite séquence d'acide nucléique sera placée sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur

approprié. A titre d'exemples non limitatifs de promoteurs utilisables dans le cadre de la présente invention, on citera : le promoteur CaMV35S [BENFEY et al, Science, 250, pp. 959-966, (1990)] ; les promoteurs *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA : nopaline synthase, octopine synthase, mannopine synthase, 1', 2' [SANDERS et al., Nucleic Acid Res., 15, pp. 1543-1558, (1987) ; HOOYKAAS and SCHILPEROORT, Plant. Mol. Biol., 19, pp. 15-38, (1992)].

La présente Invention a en outre pour objet des cellules, organes, ou tissus végétaux, transformés par au moins une séquence d'ADN conforme à l'invention, ainsi que des plantes transgéniques dont le génome comprend au moins une séquence d'ADN conforme à l'invention. Ces cellules, organes, tissus végétaux, ou plantes peuvent être obtenus par les techniques habituelles de transformation et de transgénèse végétale, qui sont connues en elles-mêmes. Bien entendu, l'invention englobe également les descendants, obtenus par semis ou par multiplication végétative, des plantes conformes à l'invention obtenues par transgénèse, dans la mesure où ces descendants contiennent également dans leur génome au moins une copie d'une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention.

Le gène synthétique *cryIC* conforme à l'invention peut notamment être utilisé pour transformer les plantes telles que le tabac, le coton, le maïs, le trèfle, la tomate, la luzerne, le chou, afin d'augmenter leur résistance aux insectes ravageurs, et notamment leur résistance vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des noctuelles, notamment du genre *Spodoptera*, en particulier *S. littoralis*, *S. exigua*, *S. frugiperda*, *S. cosmioides*, ou vis à vis des larves de lépidoptères du genre *Mamestra*, notamment *Mamestra brassicae*.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre qui se

réfère à des exemples non-limitatifs d'obtention et d'utilisation d'un gène synthétique conforme à l'invention.

EXEMPLE 1- CONSTRUCTION D'UN GÈNE SYNTHÉTIQUE *cryIC*:

5 L'assemblage du gène *cryIC* synthétique a été effectué selon la technique décrite par SARDANA et al. Plant Cell Rep., 15: 677-681, (1996), avec les modifications suivantes :

10 La séquence du gène *cryIC*, représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1 est divisée en quatre " blocs " (" A " à " D ") qui sont clonés séparément puis ligaturés entre eux pour couvrir la totalité de la séquence.

15 Chacun des blocs est synthétisé selon le protocole suivant :

Les oligonucléotides qui constituent le bloc sont mélangés en concentration équimolaire, puis soumis à une réaction de PCR.

Le mélange réactionnel (100 µl) est le suivant :

- 20 - 1 pmole de chacun des oligonucléotides
- 6 mM MgSO₄
- 250 µM dATP, dTTP, dCTP, dGTP
- 2 unités de polymérase VENT_R[®]
- 1X Tampon de réaction pour polymérase VENT_R[®]

25 Le profil de la réaction de PCR est le suivant :

1)

- 95° 3mns
- 95° → 42° en 120 mns 1 cycle
- 42° 2 mn

30 - 72° 30 secondes

2)

- 95° 1mn
- 95° → 42° en 120 mns 1 cycle
- 42° 30 secondes

35 - 72° 30 secondes

3)

- 95° 1 mn
- 42° 30 secondes 15 cycles
- 72° 30 secondes

4)

- 5 - 95° 1 mn
- 44° 30 secondes 15 cycles
- 72° 30 secondes

5)

- 72° 5 mns

10 A la fin de la réaction, le mélange est soumis à une extraction au phénol:chloroforme (1:1), puis à une extraction au chloroforme.

Une aliquote de la première réaction de PCR est ensuite soumise à une nouvelle réaction d'amplification par PCR. Dans ce cas, les amorces utilisées (oligonucléotides "externes") correspondent aux séquences des deux extrémités du bloc, auxquelles des séquences correspondant à des sites d'enzymes de restriction (en l'occurrence, le site *KpnI* à l'extrémité 5', et le site *HindIII* à l'extrémité 3') ont été ajoutées pour faciliter le clonage des produits de PCR ainsi obtenus.

Le mélange réactionnel (100µl) est le suivant :

- 30 pmoles chacun des oligonucléotides externes
- 25 - 6 mM MgSO₄
- 250 µM dATP, dTTP, dCTP, dGTP
- 2 unités de polymérase Vent_R
- 5 µl du produit de PCR de la première réaction

Les conditions de PCR sont les suivantes :

30 1)

- 93° 3 mns
- 50° 30 secondes 1 cycle
- 72° 1 mn 30 secondes

2)

- 35 - 95° 30 secondes
- 50° 30 secondes 30 cycles

- 72° 1 mn 30 secondes

3)

- 72° 3 mns

A la fin de la réaction, le mélange est soumis à une
5 extraction au phénol:chloroforme (1:1), puis à une
extraction au chloroforme.

Une aliquote du produit de la réaction (25µl) est
soumise à une électrophorèse en gel d'agarose, et la
bande correspondant à l'ADN de taille attendue est
10 isolée. Après hydrolyse à l'aide des enzymes de
restriction adéquates, dont le site de reconnaissance a
été incorporé lors de cette réaction de PCR, l'ADN est
cloné dans le vecteur pGem7Zf(-) (PROMEGA) hydrolysé par
les enzymes de restriction *KpnI* et *HindIII*. Le vecteur
15 pGem7Zf(-), outre un gène de résistance à l'ampiciline,
comporte un site de clonage multiple où sont présents des
sites de restriction pour les enzymes suivantes : *ApaI*,
AatII, *SphI*, *XbaI*, *XhoI*, *EcoRI*, *KpnI*, *SmaI*, *Csp45I*, *ClaI*,
HindIII, *BamHI*, *SacI* (= *SstI*), *BstXI*, et *NsiI*.

20 Les produits de synthèse sont vérifiés par
séquençage des deux brins d'ADN. Si aucun des clones
analysés ne contient de séquence sans erreurs, on répare
celles-ci par mutagenèse dirigée.

Les différents blocs ainsi obtenus sont
25 ligaturés entre eux pour produire le gène entier selon le
protocole suivant :

Le bloc " B ", cloné dans le vecteur pGem7Zf(-), est
hydrolysé par les enzymes de restriction *StuI* et *HindIII*,
et l'insert de ca. 580 pb isolé sur gel. Cet insert est
30 cloné en aval du bloc " A ", entre les sites de
restriction *StuI* et *HindIII*. La construction ainsi
obtenue, est nommée " A+B ".

Le bloc " C " est digéré par les enzymes de
restriction *EcoRV* et *HindIII*, et l'insert de ca. 420 pb
35 est cloné en aval du bloc " A+B ", entre les sites de

restriction *EcoRV* et *HindIII*, pour donner la construction " A+B+C " .

5 Finalement, le bloc " D " est hydrolysé par les enzymes *BglIII* et *HindIII*. L'insert de ca.610 pb est ensuite cloné en aval du bloc " A+B+C " entre les sites de restriction *BglIII* et *HindIII*.

10 La construction ainsi obtenue (" A+B+C+D ") correspond au gène *cryIC* dans son entier. Afin de s'assurer de l'intégrité de la séquence, les deux brins d'ADN sont séquencés.

15 La figure 1 représente la séquence du gène synthétique *cryIC*, indiquant les oligonucléotides utilisés pour sa construction. Chacune des flèches représente un oligonucléotide dont la séquence est indiquée. Les sites de restriction délimitant les quatre blocs (A, B, C, et D) sont encadrés : le bloc A s'étend du début du gène jusqu'au site *StuI*, le bloc B, du site *StuI* au site *EcoRV*, le bloc C est compris entre les sites *EcoRV* et *BglIII*, tandis que le bloc D s'étend du site *BglIII* jusqu'à la fin de la séquence.

20 Le bloc A a été construit à l'aide des oligonucléotides A1 à A4, le bloc B à l'aide des oligonucléotides B1 à B8, le bloc C à l'aide des oligonucléotides C1 à C6, et le bloc D à l'aide des oligonucléotides D1 à D8.

30 Pour les oligonucléotides identifiés par des numéros impairs (flèches pleines), la séquence de l'oligonucléotide utilisé correspond à la séquence indiquée sur la figure 1, tandis que pour les oligonucléotides identifiés par des numéros pairs (flèches en pointillés), la séquence de l'oligonucléotide utilisé est le complément de la séquence indiquée sur la figure 1.

35 Le sens de la flèche indique la polarité de l'oligonucléotide (de 5' en 3').

EXEMPLE 2 : TOXICITÉ DE LA PROTÉINE CryIC VIS-À-VIS DE DIFFÉRENTES ESPÈCES DE *SPODOPTERA*

Des essais biologiques ont été effectués par ingestion libre de milieu artificiel traité en surface selon la technique décrite par MÜLLER-COHN et al. [(J. Econ. Entomol., 89, 4 : 791-797, (1996)]. La protéine CryIC a été distribuée à l'aide d'une micropipette à la dose de 750ng/cm² à la surface du milieu artificiel. L'expérimentation a été effectuée sur des lots de 30 larves de différentes espèces de *Spodoptera* au stade larvaire L1 pré-mue (L1PM).

La mortalité larvaire à 5 jours a été déterminée par calcul du pourcentage de larves mortes dans chaque lot. Pour tenir compte de la mortalité dans le lot témoin, les résultats sont corrigés selon la formule d'ABBOT ci-dessous.

$$\text{Mortalité ABBOTT} = \frac{(\% \text{ de mortalité du lot traité} - \% \text{ de mortalité témoin}) \times 100}{(100 - \% \text{ de mortalité témoin})}$$

Les résultats de ces essais sont donnés dans le tableau IV ci-dessous:

TABLEAU IV

Espèce	Stade larvaire	% de mortalité à 7 jours*
<i>S. littoralis</i>	L1	77
<i>S. exigua</i>	L1	100
<i>S. frugiperda</i>	L1	50
<i>S. cosmioides</i>	L1	98

Ces résultats montrent que la protéine CryIC est active sur différentes espèces de *Spodoptera*.

EXEMPLE 3 : OBTENTION DE PLANTES TRANSGÉNIQUES ET EXPRESSION DU GÈNE SYNTHÉTIQUE *cryIC* DANS CES PLANTES

Le gène synthétique obtenu comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus a été cloné dans le vecteur binaire pKYLX71-35S² [MAITI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, pp. 6110-6114, (1993)]. Ce vecteur comprend un site de clonage multiple (comportant des sites uniques pour les enzymes de restriction *HindIII*, *XhoI*, *SacI* = *SstI* et *XbaI*) permettant le clonage du gène d'intérêt entre le

promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), dont la partie amplificateur a été doublée (P35S²), et le terminateur de la petite sous-unité de la Rubisco (tRbcS), ainsi qu'un marqueur de sélection
5 (nptII) conférant une résistance à la kanamycine, sous le contrôle du promoteur et du terminateur de la nopaline synthase.

Pour ce faire, le vecteur pGem7Zf(-) portant le gène synthétique *cryIC* entre les sites de restriction
10 *KpnI* et *HindIII* est digéré par les enzymes de restriction *XhoI* et *SstI*. L'insert de ca. 1900 pb est purifié sur gel d'agarose, et cloné dans le vecteur pKYLX71-35S² hydrolysé par les enzymes de restriction *XhoI* et *SstI*. La construction ainsi obtenue est nommée pKYcryIC.

15 Après vérification de son intégrité, la construction pKYcryIC est transférée dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 : pGV2260 [DEBLAERE et al, Nucleic Acids Res. 13 : 383-396 (1985)]

Construction de tabacs transgéniques

20 Des plants de tabac ont été transformés avec la construction pKYcryIC décrite ci-dessus, par transfert de gènes via *Agrobacterium tumefaciens* selon la méthode décrite par HORSCH et al. [Science 227 : 1229-1231, (1985)].

25 La quantité de toxine synthétisée par les plantes transgéniques, a été évaluée par transfert de protéines (Western blot), selon le protocole suivant :

Les protéines solubles totales sont extraites par broyage d'un fragment de feuille dans du tampon
30 d'extraction (50 mM Tris-HCl pH 9, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% Triton-X100). Le broyat est centrifugé, et le surnageant contenant les protéines est prélevé. La quantification des protéines est réalisée suivant la méthode de BRADFORD, [Anal. Biochem., 72 :
35 248-254, (1976)].

Les protéines (10 µg) sont soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), et transférées sur une membrane de nitrocellulose suivant le protocole standard [SAMBROOK et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)].

La détection de la toxine CryIC est réalisée à l'aide d'anticorps issus de jaune d'œuf (IgY) dirigés contre cette protéine, et d'un anticorps secondaire anti-IgY marqué à la phosphatase alcaline, suivant les techniques classiques [SAMBROOK et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)].

Le témoin négatif est constitué d'un extrait protéique provenant d'une plante témoin (transformée avec un vecteur similaire à celui des plantes résistantes mais ne portant pas le gène *cryIC*). Pour estimer la quantité de toxine CryIC produite par les plantes analysées, des échantillons constitués d'un extrait de plante témoin, auquel on ajoute une quantité croissante (de 1 à 200 ng) de toxine purifiée (gamme témoin), sont déposés sur le même gel que les extraits à analyser.

Une comparaison des intensités des bandes obtenues pour les échantillons à analyser avec la gamme témoin permet d'estimer la quantité de toxine CryIC présente dans les échantillons.

Les résultats de ces expériences montrent que, suivant les lignées testées, le taux d'expression du gène synthétique *cryIC* se situe entre 0,15 et 1% des protéines totales solubles.

EXEMPLE 4 : PROTECTION CONFÉRÉE PAR LE GÈNE SYNTHÉTIQUE DANS DES PLANTES TRANSGÉNIQUES

Les plants de tabac régénérés obtenus comme indiqué à l'exemple 3 ci-dessus sont utilisés pour effectuer des bioessais sur fragments de feuilles en utilisant des larves de *S. littoralis* à différents

stades. L1, L2 et L3 PM = stade larvaire L1, L2, L3 pré-mue).

Le protocole de ces essais est le suivant :

Les morceaux de feuilles de tabac sont
 5 découpés et déposés dans des boîtes en plastique, rondes, de 28 mm de diamètre. Le fond des boîtes est garni d'une rondelle de papier filtre humidifié, le couvercle est aéré. Dans chaque boîte, on dépose deux morceaux de
 10 feuille de tabac, puis on introduit 6 larves, de stade défini à l'avance. Cinq répétitions sont réalisées pour une plante (5 fois 6 larves par plante) Les 5 boîtes contenant une même plante sont rassemblées dans une cellule plastique. L'ensemble de l'essai est maintenu en
 15 pièce en conditions contrôlées (25°C, 16 heures de photophase) pendant 7 jours. Des contrôles intermédiaires de la mortalité sont effectués après 2 et 4 jours. Chaque
 20 essai comporte un lot témoin réalisé dans les mêmes conditions avec du tabac témoin (transformée avec un vecteur similaire à celui des plantes résistantes mais ne portant pas le gène *cryIC*).

On détermine la mortalité ABBOT comme indiqué à l'exemple 2 ci-dessus.

Les résultats de ces expériences sont présentés dans le tableau III suivant:

25

TABLEAU III

LIGNÉE	L1PM				L2PM		L3PM		
	1j	2j	4j	7j	2j	3j	2j	3j	4j
FL2	-	69	100	100	-	-	76	84	84
FL17	-	93	100	100	-	-	72	96	96
FL35	3	-	100	100	-	-	-	-	-
FL43	-	79	100	100	100	100	-	-	-
FL50	-	89	100	100	100	100	-	-	-

Protection conférée vis-à vis d'une souche de *S. littoralis* résistante à la toxine CryIC

Certains tabacs transgéniques ont été testés en utilisant une souche de *S. littoralis* résistante à la
 30 toxine CryIC, sélectionnée en laboratoire [MÜLLER-COHN et

al., (J. Econ. Entomol., 89, 4 : 791-797, (1996)). Cette souche (44ème génération après sélection) résistante est homozygote pour le facteur de résistance à la protéine CryIC, et au moment du bioessai, sa DL₅₀ envers la protéine CryIC est 367 fois plus élevée que celle de la souche sensible.

Les bioessais ont été effectués dans les conditions décrites ci-dessus, en utilisant des larves au stade larvaire L1 pré-mue (L1PM).

La mortalité ABBOT a été déterminée comme décrit ci-dessus.

Les résultats de ces bioessais (mortalité ABBOT) sont donnés dans le tableau IV ci-dessous:

TABLEAU IV

Lignée n°	L1PM RR			
	2j	3j	4j	7j
FL2	41	79	90	97
FL17	79	100	100	100

Les expériences menées montrent que, contrairement au gène natif *cryIC*, le gène synthétique s'exprime à un taux très élevé, et permet de conférer une protection efficace contre des larves de *S. littoralis* à divers stades de développement.

Le gène synthétique induit une mortalité rapide : (100% de mortalité sur des larves au stade L1 PM dans un bioessai de 4 jours) pour toutes les plantes testées. La protection conférée est également efficace contre des larves plus âgées, et par conséquent moins sensibles aux toxines (100% de mortalité sur des larves L2PM, >80% de mortalité sur des larves L3PM). En outre, les tabacs ayant intégré le gène synthétique *cryIC* montrent une protection efficace (>97% de mortalité dans un bioessai de 7 jours) contre des larves L1 PM d'une souche résistante (DL₅₀ souche résistante 367 x DL₅₀ souche sensible).

Des bioessais ont également été réalisés sur des larves de *Spodoptera frugiperda* avec la lignée FL17 de tabac exprimant le gène synthétique *cryIC* et qui entraîne 100% de mortalité sur les larves de
5 *S. littoralis* (au stade L1) à 3 jours.

Pour des larves de l'espèce *frugiperda* (au même stade larvaire L1), on observe également 100% de mortalité à 3 jours.

On constate donc une très grande efficacité du
10 gène synthétique *cryIC*, exprimé dans une plante, sur deux espèces du genre *Spodoptera*.

LISTE DE SEQUENCES

<110> INRA
CIRAD

<120> GENE SYNTHETIQUE CRYIC ET PLANTES TRANSGENIQUES
EXPRIMANT LEDIT GENE

<130> MJPCb539/88

<140>

<141>

<160> 2

<210> 1

<211> 1890

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1890)

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Gène
synthétique cryIC

<400> 1

atg gct caa att ccc cct caa tgc ata cct tac aat tgt tta agt aat	48
Met Ala Gln Ile Pro Pro Gln Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Ser Asn	
1 5 10 15	
cct gaa gaa gta ctg ctt gac gga gag cgt atc tcc acc gga aac tcc	96
Pro Glu Glu Val Leu Leu Asp Gly Glu Arg Ile Ser Thr Gly Asn Ser	
20 25 30	
tcc atc gac atc tcc ttg tcc ctt gtt cag ttc ttg gtg tcc aac ttc	144
Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Val Ser Asn Phe	
35 40 45	
gtt cca ggt gga gga ttc ctt gtg gga ctt atc gat ttc gtg tgg gga	192
Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val Trp Gly	
50 55 60	
atc gtg gga cca tcc cag tgg gac gcc ttc ttg gtt caa atc gag caa	240
Ile Val Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile Glu Gln	
65 70 75 80	
ttg atc aac gag agg atc gct gag ttc gct cgt aac gct gct atc gct	288
Leu Ile Asn Glu Arg Ile Ala Glu Phe Ala Arg Asn Ala Ala Ile Ala	
85 90 95	
aac ttg gag gga ttg gga aac aac ttc aac atc tac gtg gag gcc ttc	336
Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu Ala Phe	
100 105 110	
aag gag tgg gag gaa gat ccc aac aat cca gct aca cgt acc aga gtc	384
Lys Glu Trp Glu Glu Asp Pro Asn Asn Pro Ala Thr Arg Thr Arg Val	
115 120 125	

att gat cgc ttt cgt atc ctt gac ggt ctc ctt gag cgt gac att ccc	432
Ile Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp Ile Pro	
130 135 140	
tcc ttt cgc atc agt ggg ttc gaa gtt cca ctt ctc tca gtc tac gcc	480
Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala	
145 150 155 160	
caa gct gcc aac ctt cat ctt gcc atc ttg cgt gac tct gtc atc ttt	528
Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val Ile Phe	
165 170 175	
gga gag agg tgg ggc ctg acc act atc aac gtg aat gag aac tac aac	576
Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Ile Asn Val Asn Glu Asn Tyr Asn	
180 185 190	
aga ctc att cgc cac att gac gag tat gca gat cac tgc gct aac acc	624
Arg Leu Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala Asn Thr	
195 200 205	
tac aat cgt ggc ttg aac aat ctt ccc aag tct acc tat caa gac tgg	672
Tyr Asn Arg Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln Asp Trp	
210 215 220	
atc acc tac aac agg ctt cgt cgc gac ttg aca ttg acc gtt ctc gac	720
Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp	
225 230 235 240	
att gca gcc ttc ttt ccc aac tac gac aac cgt agg tat ccc att caa	768
Ile Ala Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Asn Arg Arg Tyr Pro Ile Gln	
245 250 255	
cca gtt ggt caa ctc act aga gag gtc tac act gac cca ctt atc aac	816
Pro Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu Ile Asn	
260 265 270	
ttc aac cca cag ttg cag tca gtt gcc cag ctt ccg acc ttc aac gtt	864
Phe Asn Pro Gln Leu Gln Ser Val Ala Gln Leu Pro Thr Phe Asn Val	
275 280 285	
atg gag tca tcc gcc atc agg aat cca cac ctc ttt gat atc ttg aac	912
Met Glu Ser Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile Leu Asn	
290 295 300	
aat ctt acc atc ttc act gac tgg ttc agc gtt ggc cgc aac ttc tac	960
Asn Leu Thr Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn Phe Tyr	
305 310 315 320	
tgg gga ggt cat cgt gtc atc tct agc ctc att ggc ggt gga aac atc	1008
Trp Gly Gly His Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly Asn Ile	
325 330 335	
act tca ccc atc tat ggt aga gaa gcc aat cag gag cct cca cgc agc	1056
Thr Ser Pro Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro Arg Ser	
340 345 350	
ttc acc ttc aac gga cct gtc ttt cgc acc ttg agc aac cct act ctt	1104
Phe Thr Phe Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro Thr Leu	
355 360 365	

cgc ctg ctc cag caa cca tgg cca gct cct ccc ttc aac ttg aga ggc	1152
Arg Leu Leu Gln Gln Pro Trp Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu Arg Gly	
370 375 380	
gtc gaa ggt gtt gag ttt agc act ccc acc aac tca ttc acc tac cgt	1200
Val Glu Gly Val Glu Phe Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Thr Tyr Arg	
385 390 395 400	
ggc aga ggt aca gtt gac agc ttg act gag ctt cca cct gag gac aac	1248
Gly Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Asp Asn	
405 410 415	
tcc gtt cca cct cgc gaa ggt tac agc cac cgt ctc tgt cac gct acc	1296
Ser Val Pro Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His Ala Thr	
420 425 430	
ttt gtg caa aga tct ggt act ccc ttc ttg acc aca ggt gtt gtg ttc	1344
Phe Val Gln Arg Ser Gly Thr Pro Phe Leu Thr Thr Gly Val Val Phe	
435 440 445	
tct tgg aca cac aga tca gcc act ctt acc aac act atc gac cca gaa	1392
Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Leu Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu	
450 455 460	
cgc atc aat cag att ccg ttg gtg aaa ggc ttc aga gtc tgg gga ggc	1440
Arg Ile Asn Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Val Trp Gly Gly	
465 470 475 480	
act tct gtc atc act ggg cca ggc ttc acc gga ggt gac att ctt cgt	1488
Thr Ser Val Ile Thr Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg	
485 490 495	
agg aac acc ttt ggt gac ttt gtc tct ctc caa gtg aac atc aac tct	1536
Arg Asn Thr Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile Asn Ser	
500 505 510	
ccg atc acc caa cgc tac aga ctg agg ttt cgt tac gcc tct agc aga	1584
Pro Ile Thr Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Ser Arg	
515 520 525	
gat gct cgt gtg att gtc ttg aca ggc gct gcc agc act gga gtt gga	1632
Asp Ala Arg Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly Val Gly	
530 535 540	
ggt caa gtt agc gtg aac atg cct ctg cag aag act atg gag att gga	1680
Gly Gln Val Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu Ile Gly	
545 550 555 560	
gag aac ctc aca tct cgc acc ttt cgt tac act gac ttc tcc aat ccc	1728
Glu Asn Leu Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser Asn Pro	
565 570 575	
ttc tcc ttt cgt gct aac cca gac atc att ggc atc tca gaa caa cct	1776
Phe Ser Phe Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu Gln Pro	
580 585 590	
ctc ttt ggt gca gga tct atc agc tcc ggt gaa ctc tac atc gac aag	1824
Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile Asp Lys	
595 600 605	

att gag atc att ctg gcc gat gct acc ttt gag gct gaa tcc gat ctc 1872
 Ile Glu Ile Ile Leu Ala Asp Ala Thr Phe Glu Ala Glu Ser Asp Leu
 610 615 620

gag cgt gct cag aag tag 1890
 Glu Arg Ala Gln Lys
 625 630

<210> 2
 <211> 629
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <223> Description de la séquence artificielle: Gène
 synthétique CryIC

<400> 2
 Met Ala Gln Ile Pro Pro Gln Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Ser Asn
 1 5 10 15
 Pro Glu Glu Val Leu Leu Asp Gly Glu Arg Ile Ser Thr Gly Asn Ser
 20 25 30
 Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Val Ser Asn Phe
 35 40 45
 Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val Trp Gly
 50 55 60
 Ile Val Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile Glu Gln
 65 70 75 80
 Leu Ile Asn Glu Arg Ile Ala Glu Phe Ala Arg Asn Ala Ala Ile Ala
 85 90 95
 Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu Ala Phe
 100 105 110
 Lys Glu Trp Glu Glu Asp Pro Asn Asn Pro Ala Thr Arg Thr Arg Val
 115 120 125
 Ile Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp Ile Pro
 130 135 140
 Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala
 145 150 155 160
 Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val Ile Phe
 165 170 175
 Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Ile Asn Val Asn Glu Asn Tyr Asn
 180 185 190
 Arg Leu Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala Asn Thr
 195 200 205
 Tyr Asn Arg Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln Asp Trp
 210 215 220
 Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp
 225 230 235 240

Ile Ala Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Asn Arg Arg Tyr Pro Ile Gln
 245 250 255
 Pro Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu Ile Asn
 260 265 270
 Phe Asn Pro Gln Leu Gln Ser Val Ala Gln Leu Pro Thr Phe Asn Val
 275 280 285
 Met Glu Ser Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile Leu Asn
 290 295 300
 Asn Leu Thr Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn Phe Tyr
 305 310 315 320
 Trp Gly Gly His Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly Asn Ile
 325 330 335
 Thr Ser Pro Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro Arg Ser
 340 345 350
 Phe Thr Phe Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro Thr Leu
 355 360 365
 Arg Leu Leu Gln Gln Pro Trp Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu Arg Gly
 370 375 380
 Val Glu Gly Val Glu Phe Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Thr Tyr Arg
 385 390 395 400
 Gly Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Asp Asn
 405 410 415
 Ser Val Pro Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His Ala Thr
 420 425 430
 Phe Val Gln Arg Ser Gly Thr Pro Phe Leu Thr Thr Gly Val Val Phe
 435 440 445
 Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Leu Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu
 450 455 460
 Arg Ile Asn Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Val Trp Gly Gly
 465 470 475 480
 Thr Ser Val Ile Thr Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg
 485 490 495
 Arg Asn Thr Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile Asn Ser
 500 505 510
 Pro Ile Thr Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Ser Arg
 515 520 525
 Asp Ala Arg Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly Val Gly
 530 535 540
 Gly Gln Val Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu Ile Gly
 545 550 555 560

Glu Asn Leu Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser Asn Pro ...
565 570 575

Phe Ser Phe Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu Gln Pro
580 585 590

Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile Asp Lys
595 600 605

Ile Glu Ile Ile Leu Ala Asp Ala Thr Phe Glu Ala Glu Ser Asp Leu
610 615 620

Glu Arg Ala Gln Lys
625

REVENDEICATIONS

1) Acide nucléique comprenant la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe par le numéro SEQ ID NO: 1.

5 2) Vecteur recombinant comprenant une séquence d'acide nucléique selon la revendication 1.

3) Plante transgénique comprenant au moins une séquence d'acide nucléique selon la revendication 1.

10 4) Plante transgénique selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle appartient à une espèce choisie parmi le tabac, le coton, le maïs, le trèfle, la tomate, la luzerne, et le chou.

15 5) Utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon la revendication 1, pour la lutte contre des insectes phytophages.

6) Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que lesdits insectes appartiennent au genre *Spodoptera*.

1/1

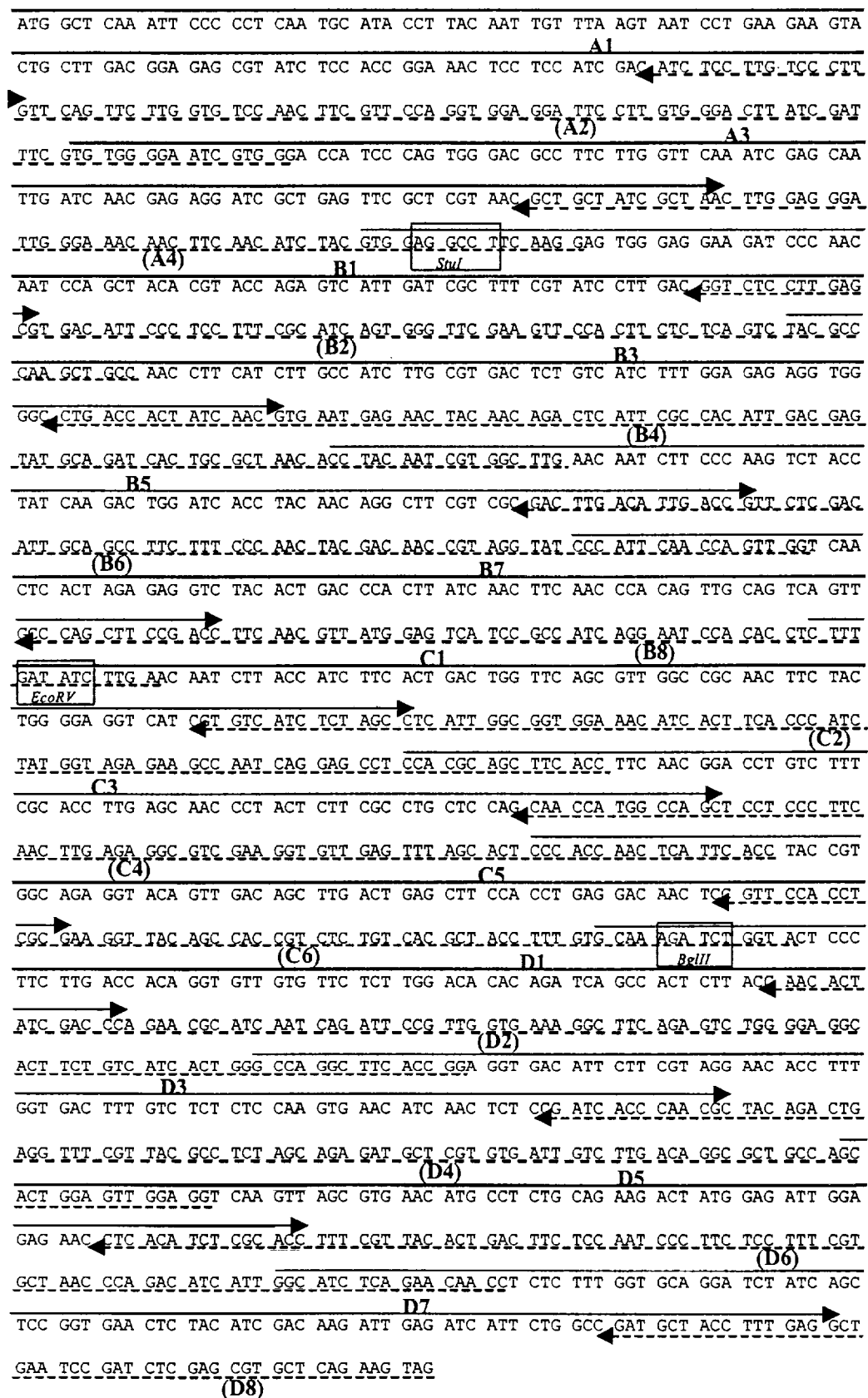


Figure 1

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n' étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN
CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
<p>MAZIER M. ET AL.: "The cryptic gene from Bacillus thuringiensis provides Protection against Spodoptera littoralis in young transgenic plants ."PLANT SCIENCE (SHANNON) , vol. 127, no. 2, 1997, pages 179-190, XP000892542 ISSN: 0168-9452 * le document en entier *</p> <p>WO 98 15630 A (KONCZ CSABA ;SCHELL JEFF(DE); STRIZHOV NICOLAI (DE); ZILBERSTEIN) 16 avril 1998 (1998-04-16) * page 5, ligne 34 - page 7 * * page 11, ligne 19 - page 34 * * figure 2 *</p> <p>STRIZHOV N ET AL: "A SYNTHETIC CRYIC GENE, ENCODING A BACILLUS THURINGIENSIS DELTA- ENDOTOXIN, CONFERS SPODOPTERA RESISTANCE IN ALFALFA AND TOBACCO" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 93, no. 26, 24 décembre 1996 (1996-12-24), pages 15012-15017, XP002064600 ISSN: 0027-8424 * le document en entier *</p> <p>PANNETIER C ET AL: "Introduction of new traits into cotton through Genetic engineering: Insect resistance as example." EUPHYTICA , vol. 96, no. 1, 1997, pages 163-166, XP000892712 ISSN: 0014-2336 * le document en entier *</p> <p>ELY S: "THE ENGINEERING OF PLANTS TO EXPRESS BACILLUS THURINGIENSIS DELTA-ENDOTOXINS" ENTWISTLE, P. ET AL. : "BACILLUS THURINGIENSIS, AN ENVIRONMENTAL BIOPESTICIDE: THEORY AND PRACTICE.",1993, pages 105-124, XP002054693 * page 115 - page 119 *</p>	<p>1-6</p> <p>1-6</p> <p>1-6</p> <p>1-6</p> <p>1-6</p>

**2.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT
L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL**

NEANT

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE
DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	